

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 09249699 A

(43) Date of publication of application: 22 . 09 . 97

(51) Int. Cl

**C07K 14/745**

**C07K 16/36**

**C07K 16/40**

**C12N 5/10**

**C12N 15/02**

**C12P 21/08**

**G01N 33/53**

**G01N 33/566**

**G01N 33/577**

**//(C12P 21/08 , C12R 1:91 )**

(21) Application number: 08080496

(22) Date of filing: 11 . 03 . 96

(71) Applicant: FUJIREBIO INC

(72) Inventor: UCHIDA YOSHIAKI  
KURANO YOSHIHIRO

(54) ANTIHUMAN PIVKA-II MONOCLONAL  
ANTIBODY, HYBRIDOMA CAPABLE OF  
PRODUCING THE SAME ANTIBODY AND  
MEASURING REAGENT AND MEASUREMENT  
USING THE SAME ANTIBODY

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce a monoclonal antibody and a reagent for carrying out the measurement of a human protein induced by vitamin K absence-II (PIVKA-II) in a specimen.

SOLUTION: A lymphocyte obtained by immunizing a mammal with an immunogen comprising a peptide represented by the formula is fused to a cell of a myeloma of a mammal to prepare a hybridoma. An antihuman PIVKA-II monoclonal antibody is obtained therefrom. The resultant antibody is used to produce a measuring reagent to carry out the immunoassay of the human PIVKA-II contained in a specimen.

Gly Asn Lys Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe  
Glu Ala

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-249699

(43)公開日 平成9年(1997)9月22日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K	14/745		C 0 7 K	14/745
	16/36			16/36
	16/40			16/40
C 1 2 N	5/10		C 1 2 P	21/08
	15/02		G 0 1 N	33/53
				L
			審査請求 未請求 請求項の数 8 FD (全 9 頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号 特願平8-80496

(22)出願日 平成8年(1996)3月11日

(71)出願人 000237204

富士レビオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72)発明者 内田 好昭

東京都新宿区西新宿2丁目7番1号 富士  
レビオ株式会社内

(72)発明者 倉野 義裕

東京都新宿区西新宿2丁目7番1号 富士  
レビオ株式会社内

(54)【発明の名称】 抗ヒトP I VKA-I Iモノクローナル抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いた測定試薬及び測定方法

(57)【要約】

【課題】 検体中のヒトP I VKA-I Iの測定を行うためのモノクローナル抗体及び試薬の提供。

【解決手段】式

【化1】

Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe  
Glu Ala

で表されるペプチドからなる免疫原を哺乳動物に免疫して得たリンパ球と哺乳動物のミエローマ細胞との融合によりハイブリドーマを作成し、次いでこのハイブリドー

マから抗ヒトP I VKA-I Iモノクローナル抗体を得る。この抗体を用いて測定試薬を製造し、検体中に含まれるヒトP I VKA-I Iの免疫測定を行う。

## 【特許請求の範囲】

Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe  
Glu Ala

で表されるペプチド。

## 【請求項2】 式

Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe  
Glu Ala

で表されるペプチド。

【請求項3】 請求項2記載のペプチドからなる免疫原を哺乳動物に免疫して得られたリンパ球と哺乳動物のミエローマ細胞との融合によって得られるハイブリドーマ。

【請求項4】 請求項2記載のペプチドからなる免疫原を免疫した哺乳動物より取得したリンパ球と哺乳動物のミエローマ細胞との融合によって作成されたハイブリドーマを培養することにより得られるヒトP I VKA-I Iと反応するモノクローナル抗体。

【請求項5】 ヒトP I VKA-I Iとは反応するが、ヒトトロンビンとは実質的に反応しない請求項4記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】 E 7-222 (FERM P-1538)  
6) 細胞が產生する請求項4又は5記載のモノクローナル抗体。

【請求項7】 請求項4ないし6記載のモノクローナル\*

Ala Asn Thr Phe Leu Gla Gla Val Arg Lys Gly Asn Leu Gla Arg Gla Cys Val  
1  
Gla Gla Thr Cys Ser Thr Gla Gla Ala Phe Gla Ala Leu Gla Ser . . . .  
20  
30

で示される。このプロトロンビンが生体内で產生される際に、ビタミンKの欠乏、肝機能不全、ビタミンK拮抗剤の投与、肝細胞障害等に起因して、プロトロンビン中の10個のγ-カルボキシグルタミン酸(Gla)の一部あるいは全部のカルボキル化が不完全なグルタミン酸(Glu)残基を有する糖蛋白質が血液中に見出されることが知られている。この蛋白質は異常プロトロンビン即ちヒトP I VKA-I Iと呼ばれている。近年、肝細胞癌患者において、血漿中にヒトP I VKA-I Iが高率で発現することが報告され、肝細胞癌のマーカー、診断のミニターに利用されるようになった。

【0003】従来ヒトP I VKA-I Iを測定するために、ポリクローナル抗体による競合RIA法が行われていたが、更に選択的な測定を実施するためにヒトP I VKA-I Iに対するモノクローナル抗体が作成された。この抗ヒトP I VKA-I I抗体は、ワーファリン服用患者血漿からプロトロンビンを除去後、正常プロトロンビン及びP I VKA-I Iの両者に対する共通部分のモノクローナル抗体を用いたアフィニティカラムで精製したヒトP I VKA-I Iを得、これを免疫原として用い、哺乳動物に免疫後得られた脾臓細胞と腫瘍細胞との

## 【請求項1】 式

## 【化1】

\*抗体からなるヒトP I VKA-I Iの免疫測定試薬。

10 10 【請求項8】 請求項7記載の測定試薬を用いてなるヒトP I VKA-I Iの免疫測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトP I VKA-I I (Protein induced by vitamin K absence-II)の測定に用いられるモノクローナル抗体を製造するためのペプチド、該抗体を產生するハイブリドーマ、抗ヒトP I VKA-I Iモノクローナル抗体、該抗体からなる免疫測定試薬及びその測定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ヒトP I VKA-I Iは、血液凝固に関するプロトロンビンに類似した構造を有する糖蛋白質である。プロトロンビンは、蛋白質のN末端の近傍に10個のγ-カルボキシグルタミン酸(Gla)残基を有し、そのアミノ酸配列は

Ala Asn Thr Phe Leu Gla Gla Val Arg Lys Gly Asn Leu Gla Arg Gla Cys Val  
1  
Gla Gla Thr Cys Ser Thr Gla Gla Ala Phe Gla Ala Leu Gla Ser . . . .  
20  
30

ハイブリドーマを作成し取得していた。さらにこのモノクローナル抗体を固相に結合させ、二抗体サンドイッチ法を利用した酵素免疫測定試薬が製造されていた(特公平5-43357号参照)。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】従来ヒトP I VKA-I Iと反応するモノクローナル抗体を製造するには、ヒト血漿中に含まれる精製したヒトP I VKA-I Iを免疫原として用いているが、このヒトP I VKA-I Iが混合物であるため精製は難しく、取得した精製抗原を用いモノクローナル抗体を製造することは容易ではなかった。さらにヒトP I VKA-I Iペプチドは、構成アミノ酸のγ-カルボキシグルタミ酸が不安定なために容易には合成することができない等の問題点があった。また、肝細胞癌患者の早期診断にはヒトP I VKA-I Iの高感度測定が望まれている。しかしながら従来法で得たモノクローナル抗体から製造した測定試薬では、検体中に含まれる低濃度のヒトP I VKA-I Iを測定するのは非常に難しかった。そこで測定試薬にはヒトP I VKA-I Iとの反応性が高く、ヒトトロンビンとの交差反応を起こさない新たなモノクローナル抗体が求められ

ていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究の\*

Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe  
Glu Ala (I)

で表されるペプチドを見出し、このペプチドから製造された免疫原を哺乳動物に免疫しハイブリドーマを作成し、次いでモノクローナル抗体を得て本発明を完成するに至った。

【0006】本発明の前記式(I)で表されるペプチドは、20個のアミノ酸残基で構成される。この前記式(I)で表されるペプチドは、前記ヒトプロトロンビンのアミノ酸配列のうちN末端の11番目から30番目のアミノ酸残基において、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸(Gla)がグルタミン酸(Glu)に置換した化合物である。このペプチドは、公知ペプチド合成の方法に従い製造することができる。ペプチド合成の方法としては、例えば $\alpha$ -アミノ基をt-ブートキシカルボニル(Boc)基、側鎖官能基をベンジルアルコール系保護基で保護するBoc法、 $\alpha$ -アミノ基を9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基、側鎖官能基をt-ブチルアルコール系保護基で保護するFmoc法等を挙げることができる。これらのペプチド合成法は、液相法又は固相法で実施することができる。液相法は、前記保護アミノ酸を順次縮合反応と脱保護反応とを溶液中で繰り返し目的とするペプチドを製造することができる。また固相法※

Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe  
Glu Ala (II)

で表されるペプチドを製造することができる。前記式(II)で表されるペプチドは、PIVKA-IIの三次元構造と類似するため、抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を製造するための免疫原として用いるには好ましい。

【0008】次いで前記式(II)で表されるペプチドは免疫原として哺乳動物に投与しリンパ球細胞を得、ヒトPIVKA-IIを認識するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを製造することができる。この前記式(II)で表されるペプチドを免疫原として用いるためには、ペプチドのN末端又はC末端のそれぞれに10個までのアミノ酸残基を結合させてペプチド誘導体を製造して用いることができる。またこれらのペプチドは前記式(II)で表されるペプチド又はその誘導体を単独に哺乳動物に投与し免疫することができるが、当業者には周知の方法により各種キャリアーとなる蛋白質との複合体を製造し、この複合体を投与することがさらに効率よく抗体產生リンパ球を取り出すためには好ましい。キャリアー蛋白質としては例えばKLH(Keyhole Limpet Hemocyanin)、BSA(ウシ血清アルブミン)、MSA(マウス血清アルブミン)等を用いることができる。

\*結果、ヒトプロトロンビンのN末端のアミノ酸の $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸(Gla)が全てグルタミン酸(Glu)に変換された式

Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe

※は、担体として架橋したポリスチレン樹脂、ポリアクリルアミドで被覆したシリカ担体等の不溶性の担体上で保護アミノ酸の縮合反応、N- $\alpha$ -アミノ保護基の脱保護反応等を繰り返すことにより実施することができる。さ

らに固相法は、自動合成機を用いて行うことが効率よく目的のペプチドを製造するためには好ましい。前記合成法で製造されたペプチドは、保護基をフッ化水素、トリフルオロ酢酸(TFA)、トリフルオロメタンスルホン酸(TFMSA)/TFA、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホン酸(TMSOTf)/TFA、トリメチルシリルプロミド(TMSBr)/TFA、テトラフルオロホウ酸(HBF<sub>4</sub>)/TFA等を用いて除去し、精製して目的のペプチドを製造することができる。

【0007】このようにして製造された前記式(I)で表されるペプチドは、ペプチド鎖中のCysが還元型で形成されているが、前記式(I)で表されるペプチド中の2個のCys残基のチオール基を酸化し、ジスルフィド結合で分子内架橋した環状のペプチド構造を有する酸化型の式

【化2】

Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe

この複合体を製造するには、例えば前記式(II)で表されるペプチドとキャリアー蛋白質との官能基を縮合し化学結合させる方法、架橋剤を用い両者を化学結合させる方法等を用いることができる。

【0009】さらに、前記した免疫原となるペプチドを免疫しモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを製造することができる。この製造方法は、まずハイブリドーマを作成するため抗原を免疫した哺乳動物のリンパ球と、これと融合させる哺乳動物のミエローマ細胞(骨髄腫細胞)を用意する。この前記リンパ球を採取するには、例えば前記前記(II)で表されるペプチドとキャリアー蛋白質とを結合させた複合体からなる抗原を作成し、この抗原をマウス、ラット等の哺乳動物に免疫する。

【0010】この免疫法は、従来の抗血清を取得する方法に準じ、抗原の使用量、投与部位、アジュバント等を使用し実施することができる。この方法として例えばマウスを用いる場合、マウス一匹あたり一回につき0.01mg~1mg、好ましくは0.01mg~0.1mgの前記複合体を初回はアジュバント(例えばフロイントの完全アジュバント)とよく混合して、皮下、腹腔内

等に投与し、2週間以上経過後、再びアジュバンド（例えばプロインントの不完全アジュバンド）をよく混合して、皮下、腹腔内等に投与する。さらに二週間経過後、前記複合体を静脈内、皮下、腹腔内等に投与して充分免疫する。このように免疫されたマウスを好ましくは最終免疫から2～4日後に殺し、リンパ球を採取する。リンパ球の調整には、脾臓、リンパ節、末梢血等が用いられる。得られたリンパ球は培養液中に懸濁した状態で保存される。

【0011】一方ミエローマ細胞は、前記免疫に用いた動物と同じ種由來のものを使用することが好ましい。さらにそのミエローマは薬剤抵抗性の変異株であることが好ましく、さらに未融合のミエローマ細胞がハイブリドーマ選択培地で生育しないものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えば市販のマウスミエローマP3・X63・Ag8・6・5・3 (X63・6・5・3) ; P3・X63・Ag8・U1 (P3U1) ; ラットミエローマ210・RCY3・Ag1・2・3等を用いることができる。

【0012】このミエローマ細胞を血清、好ましくは牛胎児血清を含有するダルベッコ変法イーグル最少培地(DMEM)、RPMI1640培地等の培地で培養する。次にDMEM、RPMI1640等の培地に上記で得たリンパ球及びミエローマ細胞を各々懸濁し、混合する。この時の混合比は任意に選択できるが、好ましくはリンパ球：ミエローマ細胞が細胞数で1：1～20：1、好ましくは2：1～5：1の比率で用いることができる。混合した細胞は、融合促進剤を用いて融合を行う。融合方法としては、例えばImmunological Methods; Vol. 2, 1981, Academic Pressに従い行うことができる。融合促進剤としては、種々の高分子化合物、ウイルス等を用いることができる。この融合促進剤として、例えばポリエチレングリコール(PEG), センダイウイルスを挙げることができる。PEGは平均分子量400～20,000のものを使用することができるが、1,000～7,500のものを用いることが好ましい。融合促進剤の使用濃度は、40～60v/o 1%である。

【0013】融合させた細胞は、洗浄して融合促進剤を除去し、5～15v/o 1%の血清を含むDMEM又はRPMI1640培地に懸濁し、96穴培養皿等に0.1～1×10<sup>6</sup>/穴の割合で分注する。さらに、各穴に選択培地（例えば、HAT培地）を加え、適宜選択培地を交換することによりハイブリドーマを選択することができる。

【0014】次にヒトPIVKA-IIに対する抗体を产生するハイブリドーマを検索、選別する。その方法にはELISA法を用いることができる。精製PIVKA-IIをELISAプレートに吸着させ、これにハイブリドーマ上清を加え反応を行った後、洗浄し市販の免疫動物免疫グロブリンに対する標識抗体（例えば西洋ワサ

ビバーオキシダーゼ(HRP)標識抗体あるいはヨウ素125標識抗体）を添加する。その結果ハイブリドーマ上清中にヒトPIVKA-IIに対する抗体が存在する場合には、その抗体が固相ヒトPIVKA-IIに結合し、さらに免疫グロブリンに対する標識抗体がこれに結合して、標識によるシグナルが得られる。一方、上清中にヒトPIVKA-IIに対する抗体が存在しない場合には、固相の複合体には何も結合せず従ってシグナルも得られない。このように、標識によるシグナルの有無を手がかりとしてハイブリドーマの選択を行うことができる。

【0015】このハイブリドーマ細胞株は、通常用いられる培地で増殖可能である。例えば牛胎児血清を5～20%含有するRPMI1640又はDMEMを培地として用い、37℃炭酸ガス濃度5v/o 1%含有空気下でよく増殖する。また、ハイブリドーマ細胞株はミエローマの持つ増殖性を有するので、生体内（例えば同系の動物、ヌードマウス等）で増殖し、ヒトPIVKA-IIに対する抗体を産生することができる。

【0016】このようにして得られた抗体は、必要に応じ精製して使用することができる。精製には例えば硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAを固定したアフィニティーコロマトグラフィー等、通常の蛋白質を精製する手段を用いることができる。

【0017】前記方法により製造したモノクローナル抗体を用いてPIVKA-IIの測定試薬を製造することができる。試薬を製造するには、まず間接凝集免疫測定、標識免疫測定等の免疫測定用固相に抗体を結合させ製造することができる。固相としては、例えばゼラチン、アラビアゴム及びメタリン酸塩を不溶化して得られるゼラチン粒子、羊、山羊、馬、牛、家兔等の哺乳動物赤血球、ラテックス、カオリン等の凝集免疫測定用粒子、プラスチック試験管、マイクロタイタープレート、ガラスビーズ、プラスチックビーズ、メンブレン等の標識免疫測定用固相を挙げることができる。

【0018】固相とモノクローナル抗体との結合には、公知の共有結合又は非共有結合を作る方法を利用して製造することができる。結合の方法には、例えばグルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法、ピリジル・ジスルフィド法、各種架橋剤を用いる方法等を挙げることができる（例えば「蛋白質核酸酵素」別冊31号、37～45頁（1985年）参照）。共有結合による方法では、モノクローナル抗体に存在する官能基を利用するほか、抗体に例えばチオール基、アミノ基、カルボキシル基、水酸基等の基を導入した後、前記結合方法に従い反応を行うことができる。また非共有結合による方法としては物理吸着法等を挙げるとができる。結合に用いるモノクローナル抗体は、前記抗体を酵素処理して製造した抗体のFab, F(ab')<sub>2</sub>等のフラグメントであってもよい。

【0019】前記ヒトPIVKA-IIの免疫測定試薬は、検体と反応させて検体中のヒトPIVKA-IIを測定することができる。前記間接凝集試薬では、検体と反応させその凝集像から検体中のヒトPIVKA-IIの測定を行うことができる。また標識免疫測定試薬は、標識した抗ヒトPIVKA-II抗体又は抗プロトロンビン抗体等と組み合わせたサンドイッチ法、標識ヒトPIVKA-IIを用いた競合法等の周知の方法に従い測定を行うことができる。この標識物としては、免疫測定に用いられる例えば酵素、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、着色粒子、コロイド粒子等を挙げることができる。標識免疫測定法では、反応後固相に結合した前記標識物を直接的又は間接的に検出し測定を行うことができる。検出には標識物によりそれぞれ対応する目視による方法の他、シンチレーションカウンター、比色計、蛍光光度計、フォトンカウンター、感光フィルム等の測定装置を用い標識物の測定を行うことができる。標識物が酵素の場合には発光基質、蛍光基質、発色基質等を加えて反応液に生ずる発光、蛍光、発色等を目視又は前記測定装置を用いて測定を行うことができる。

【0020】本発明は、測定検体に制限はなく例えば血清、血漿、全血、尿、リンパ液等の各種体液中のPIVKA-IIの測定に適用することができる。

#### 【0021】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

#### 【0022】実施例1 ペプチド（前記式（I）で表されるペプチド）の製造

アプライドバイオシステムズ431Aペプチド合成機（パーキンエルマー社製）を用いて合成を行った。アミノ酸はグリシンを除いて、すべてL体を用いた。各アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基はFmoc（9-フルオレニルメトキシカルボニル）基で保護し、アミノ酸側鎖官能基の保護には以下の保護基を使用した。Cysの $\beta$ -スルフヒドリル基とAsnの $\beta$ -カルボキサミド基はTrt（トリフェニルメチル）基、Gluの $\gamma$ -カルボキシル基、Ser、Thrの $\beta$ -水酸基及び Tyrのフェノール性水酸基はすべてt-Bu（t-ブチル）基、Argのグアニジノ基はPMC基（2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル）基。

【0023】ペプチド合成を開始するための固相担体は、HMPレジン（パーキンエルマー社）を用い最初にFmoc-A1aを431合成機に添付されている合成プログラムであるLoading Cycleにより導入した。ペプチド鎖の延長は、431A合成機の標準的な方法であるFmoc/HOBt/NMP法で自動的に行つた。反応を0.25mmolのスケールで開始し、1070mg（収率86%）の保護基を含むペプチド担体を得た。

【0024】上記担体を添加物を含むトリフルオロ酢酸

10

溶液（トリフルオロ酢酸10ml、水0.5ml、フェノール0.4g、チオアニソール0.5ml、エタンジチオール0.25ml）中室温で90分間処理して、遊離のペプチド鎖を取り出し、ジエチルエーテルで沈殿させ、ろ取した。さらにこの沈殿を添加剤を含むトリフルオロ酢酸溶液（トリフルオロ酢酸10ml、チオアニソール0.5ml、エタンジチオール0.25ml）中で氷冷下40分処理し、ジエチルエーテルで沈殿させ、ろ取し、水に懸濁後凍結乾燥して前記式（I）で表される粗ペプチド390mg（収率68%）を得た。

【0025】前記式（I）で表されるペプチドに含まれる2つのCys残基がスルフヒドリル（SH）型の還元型であることを確認するため以下の実験を行つた。得られた前記式（I）で表される粗ペプチドを1MTris-HCl緩衝液（pH8.9）に溶解し、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィで分析した。溶解直後の分析（図1, a）では、主に保持時間が14.5分、16.9分、19.9分にピークが見られたが。2時間後（図1, b）には16.9分のピークはほぼ消失し、主に14.5分、19.9分のピークが見られた。この溶液に還元剤であるジチオスレイトール（DTT）を過剰量加えたものを分析したところ（図1, c）14.5分、19.9分のピークはなくなり、（DTTの還元型、酸化型のピークを除いて）16.9分のピークだけとなつた。

【0026】これらの結果から、14.5分のピークはCys残基側鎖がジスルフィド結合した酸化型の一量体、16.9分のピークは還元型、19.9分のピークは酸化型の二量体であることが明らかとなつた。従つて溶解前の粗ペプチドは還元型を主に含むと考えられる。

#### 【0027】実施例2 前記式（I I）で表されるペプチド（E7）の製造

前記実施例1で製造した式（I）で表されるペプチド53.2mgを0.2MTris-HCl緩衝液（pH8.9）50mlに攪拌しながら加え溶解した。この溶液を室温で激しく攪拌し、空気酸化を行つた。高速液体クロマトグラフィで反応を追跡し、3時間後に反応液を酢酸で中和した。この溶液をMCI GEL CHP20P（三菱化学会）カラム（12ml）に通してペプチドを吸着させ、30%アセトニトリルを含む0.1%アンモニア水で溶出し、パウリ反応陽性の部分を集めて凍結乾燥した。45.35mg（収率82%）の前記式（I I）で表される粗ペプチドを得た。さらにこのペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィ（カラム：Asahipack ODP-90 21.5ml.D. × 300mmL；溶媒：0.1%トリフルオロ酢酸/水と0.1%トリフルオロ酢酸/アセトニトリルの10～60%直線濃度勾配）で精製し、溶出画分を減圧下濃縮後、凍結乾燥し前記式（I I）で表されるペプチド（以下E7という。）12.6mg（収率28%）を得た。

50

【0028】E 7ペプチドを加水分解しアミノ酸分析を行った。加水分解は、ペプチド1. 03mgを試験管にとり、濃塩酸一トリフルオロ酢酸(2:1)を加え、減圧下脱気、封管し、166℃のヒートブロック中で25分間行った(A. Tsugita, J.-J. Scheffler, Eur. J. Biochem., 124, 585 (1982)参照)。アミノ酸分析は、JLC-300全自动アミノ酸分析計(日本電子製)でニンヒドリン法で行った。その結果を以下に示す。Asp 1. 02(1), Thr 0.70(1), Ser 0.56(1), Glu 6.64(7), Gly 1.00(1), Ala 2.00(2), Cys 1.70(2), Val 0.96(1), Leu 1.00(1), Tyr 0.95(1), Phe 0.99(1), Arg 0.99(1)カッコ内は配列からの予想値

【0029】また、ペプチドをProtein Sequencer Precise 494(パーキンエルマー社製)にかけて分析を行った。その結果を図2に示す。

【0030】実施例3 E 7-KLH複合体の作製

KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin; CALBIOC HEM社製)5mgを400μlの1%のジチオスレートールを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、同緩衝液100μlに溶解した2-イミノチオラン塩酸塩(SIGMA CHEMICAL社製)1mgを加え、室温で1時間攪拌した。反応液を1mMのEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したPD-10カラム(ファルマシアバイオテク社製)にかけ、同緩衝液で溶出した。カラム溶出液の初めの2.5mlは廃棄し、それに続く2.0mlを集めた。

【0031】一方、E 7 2.31mgを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)800μlに溶解し、DMF(ジメチルホルムアミド)230μlに溶解したGMB S 0.30mg加え、室温で1時間攪拌した。反応液を前記KLH溶液と混合し、室温で1時間攪拌した。0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)100μlを溶解したマレイミド1mgを加えさらに1時間攪拌した後、反応液を透析チューブに移し、PBS(リン酸化生理食塩水)に対し4℃で一夜透析し、E 7-KLH複合体溶液を得た。この溶液の蛋白濃度は、BCA Protein Assay Reagent (PIERCE社製)により定量し、810μg/mlであった。

【0032】実施例4

(1) 抗PIVKA-IIモノクローナル抗体の作製

実施例3で作製したE 7-KLH複合体をフロイント完全アジュバンドに充分分散させ、マウス(BALB/C)腹腔に100μl(約40μg/マウス)で免疫した。約1ヶ月後同じくE 7-KLHをフロイント不完全アジュバンドに分散させ腹腔に免疫した。抗体価の上昇の確認後、静注によりE 7-KLH複合体を投与し、3日後脾臓を摘出し、ミエローマ細胞との融合を実施した。融合した細胞は、96ウエルカルチャープレートに分注し、炭酸ガスインキュベーターで培養した。培 50

10

20

30

30

40

50

養上清中の抗ヒトPIVKA-II抗体の有無は、ワーファリン投与患者血漿から精製したヒトPIVKA-IIを固相化したELISAプレートで調べた。又特異性に関しては同時にプロトロンビン(シグマ社製)を固相化したELISAプレートを用いて調べた。これらELISAにて確認された抗PIVKA-II特異抗体産生ウエルの細胞を限界希釈法にてモノクローナル化した。抗ヒトPIVKA-IIモノクローナル抗体を産生する細胞は、大量に培養しマウス腹腔に投与し、抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を大量に含む腹水を回収した。さらにProtein A-Sepharoseを用い腹水より抗体を精製し、モノクローナル抗体を得た。この抗ヒトPIVKA-IIモノクローナル抗体をE 7-222抗体と命名し、E 7-222抗体を産生するハイブリドーマを平成8年1月9日に通産省工業技術院生命工学工業研究所特許微生物寄託センターに寄託手続きを行い、菌寄第15386号(FERM P-15386)として受け入れられた。

【0033】(2) 固相化抗原に対するE 7-222抗体の反応性

Nunc社製96ウエルELISAプレートに精製PIVKA-II、プロトロンビンをそれぞれ2μg/mlの濃度に75μl/ウエルで4℃一夜放置し、コートした。プレートは1%スキムミルクPBSを各ウエルに150μl入れ、37℃、5時間ブロッキングした。次にプレートを0.05%Tween(登録商標)20を含むPBSで3回洗浄した後、1%BSA含有Tris緩衝液pH7.4に5μg/mlに溶かしたE 7-222抗体とコントロールとしてF1-3抗体(抗プロトロンビンモノクローナル抗体)75μl/ウエルで加え37℃、1時間反応させた。反応後、0.05%Tween20含有PBSで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体(DACO社製)を加え、37℃1時間反応させた。反応後0.05%Tween20含有PBSで4回洗浄し、基質ABTSを加え405nmの吸光度を測定した。結果を図3に示す。E 7-222抗体は固相化ヒトPIVKA-IIには反応するが、プロトロンビンとは実質的に反応せずヒトPIVKA-IIに特異的である。

【0034】実施例5 固相化E 7-222抗体を用いたELISAによる検体中のヒトPIVKA-IIの測定

精製E 7-222抗体をPBSに10μg/mlに溶かし、Nunc社製96ウエルELISAプレートに75μl/ウエルで加え、4℃一夜放置し、抗体をコートした。プレートは1%スキムミルクPBSを各ウエルに150μl入れ、37℃5時間ブロッキングした。0.05%Tween20含有PBSで洗浄した後、10%のCal f Serumを含んだ0.1%Tris緩衝液(pH7.4)35μlと血清35μlをウエルに加

え、37℃1時間反応させた。反応後プレートを0.05%Tween 20を含むPBSで3回洗浄し、アルカリホスファターゼ標識F1-3抗体（抗プロトロンビンモノクローナル抗体）を75μl/ウェルで加え、37℃1時間反応させた。プレートは同様に0.05%Tween 20含有PBSで3回洗浄後、蒸留水で1回洗浄し、基質パラニトロフェニルホスフェート（PNP）を加え、37℃1時間反応後405nmの吸光度を測定した。陽性検体10例、陰性検体5例について、本発明の測定試薬と従来のPIVKA-II測定試薬（エイテストモノP-II；エーザイ社製）で測定を行い、その結果を図4に示す。

### 【0035】

【発明の効果】本発明は、前記式（II）で表されるペプチド配列

Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Thr	Cys	Ser	Tyr	Glu	Glu
1					5					10				15	
Ala	Phe	Glu	Ala												
				20											

### 【図面の簡単な説明】

【図1】前記式（I）で表されるペプチド及び前記式（II）で表されるペプチドの高速液体クロマトグラフィでの分析結果を示す図である。

【図2】前記式（II）ペプチドのアミノ酸配列分析結果を示す図である。

\* プチドからなる免疫原を用いることにより、検体中のヒトPIVKA-IIと特異的で高い反応性を持つ抗ヒトPIVKA-IIモノクローナル抗体が得られた。該抗体から製造された免疫測定試薬は、検体中のヒトプロトロンビン等の影響を受けず、低濃度のヒトPIVKA-IIを感度よく測定することができる。

### 【0036】

#### 【配列表】

配列番号：1

10 配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

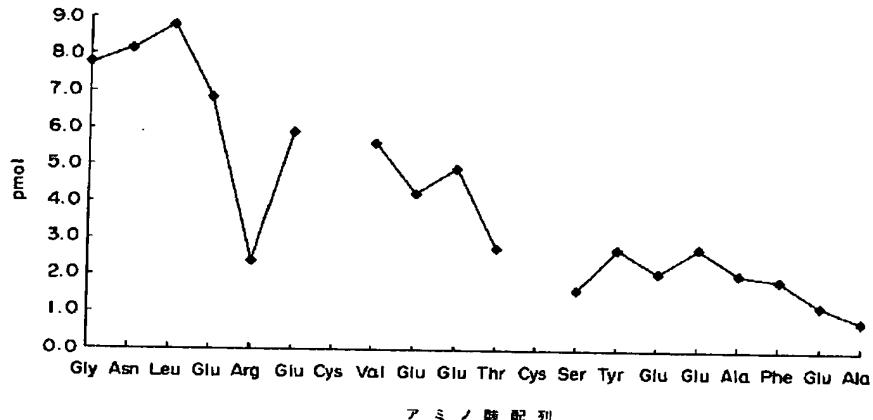
トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

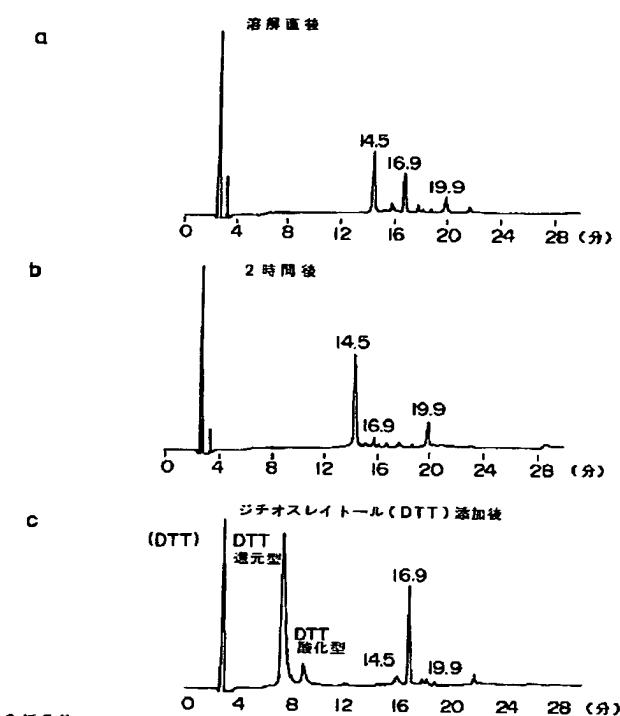
※ 【図3】PIVKA-II又はプロトロンビンへのE7-222抗体の反応性を示すELISA法の測定結果を示す図である。

【図4】従来のPIVKA-II測定試薬（エイテストモノP-II；エーザイ社製）と本発明の測定試薬とのELISA法での測定結果を示す図である。

### 【図2】



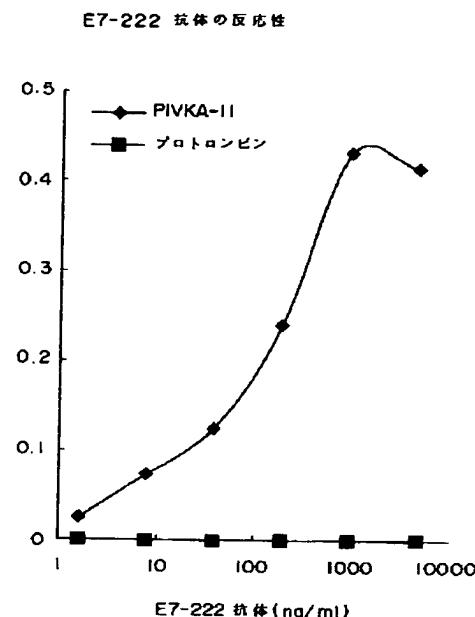
【図1】



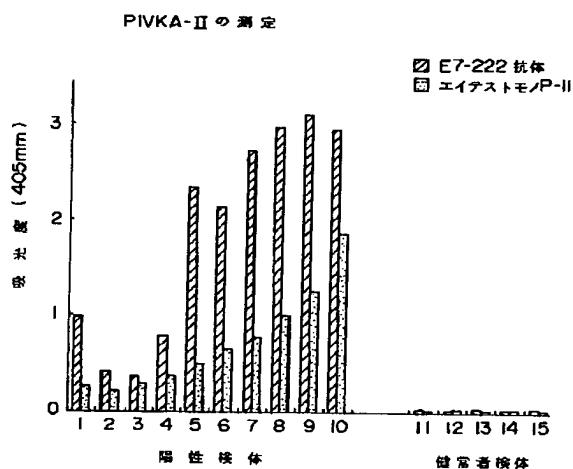
## 分析条件

カラム: Asahipack ODP-50 4.6mmI.D. x 250mmL. (昭和電工)  
 溶媒: A: 0.1% トリフルオロ酢酸/水  
 B: 0.08% トルフルオロ酢酸/アセトニトリル  
 B = 10-60% の直線濃度勾配  
 検出: UV(220nm)

【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6  
 C 12 P 21/08  
 G 01 N 33/53

識別記号 庁内整理番号

F I  
 G 01 N 33/53  
 33/566

技術表示箇所

D

(9)

特開平9-249699

33/566	33/577	
33/577	C 1 2 N	5/00
//(C 1 2 P 21/08	9282-4B	15/00
C 1 2 R 1:91)		B
		C